Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Bestimmung optimaler Bedingungen für die indirekte Objektträgerhaemagglutination und ihre Anwendung in der Praxis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
URSULA BLEYH
aus München

1964

7782

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Bestimmung optimaler Bedingungen für die indirekte Objektträgerhaemagglutination und ihre Anwendung in der Praxis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
URSULA BLEYH
aus München

1964

B. MED. BIBLIOTHEK TÜBINGEN

Dekan: Professor Dr. med. Heinrich HARMS

Berichterstatter: Professor Dr. med. Richard-Ernst BADER

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Eigene Untersuchungen	3
	1. Material	3
	2. Vorversuche	4
	3. Versuche zur Verbesserung der Ergebnisse der indirekten Objektträgerhaemagglutination	7
	4. Versuche zur Anlagerung verschiedener Antigene an die gleichen Erythrocyten	11
	5. Haltbarkeitsprüfung der sensibilisierten Erythrocytensuspension	13
	6. Vergleich der indirekten Objektträgerhaemagglutination mit der Widal-Reaktion	14
III.	Diskussion	17
IV.	Zusammenfassung	18
V.	Literatur	19
	Lebenslauf	

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0087

I. EINLEITUNG

Die indirekte Haemagglutination, die zum ersten Mal von KEOGH und Mitarbeitern (1947 und 1948) beschrieben wurde, ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die durch eine Agglutination von Erythrocyten sichtbar gemacht wird. Hierbei reagieren Antikörper des Serums mit gelösten Antigenen, die in einem vorausgegangenen Arbeitsgang an die Erythrocyten angelagert worden sind. Für die Anlagerung kommen nur die bei der Antigenherstellung in Lösung gegangenen O-Antigene in Betracht, während die H-Antigene nicht angelagert werden können. Die Verwendung gelöster Antigene ermöglicht somit eine isolierte O-Agglutination.

Eine andere Art, mit gelösten Antigenen eine Antigen-Antikörper-Reaktion auszuführen, ist die Präzipitationsreaktion, die aber technisch schwieriger durchzuführen ist als die indirekte Haemagglutination.

Es bestehen zwei Möglichkeiten, die indirekte Haemagglutination auszuführen. Einmal im Röhrchen, wie sie von MIDDLEBROOK und DUBOS (1948) entwickelt wurde und zum andern auf dem Objektträger, wie sie von FELSENFELD und Mitarbeitern (1955), FREEMAN und FELSENFELD (1955) und SIEBURTH (1958) ausgeführt wurde. Felsenfeld stellte Vergleiche an zwischen der Röhrchenhaemagglutination und der Objektträgerhaemagglutination unter Verwendung von V. comma-Antigen und -Antiserum. Er kam zu dem Ergebnis, daß die bei der Objektträgerhaemagglutination erzielten Titer gleich oder niedriger waren als die, die sich bei der Röhrchenhaemagglutination ergaben. Auch Freeman verglich beide Methoden. Er kam zu dem Schluß, daß die Objektträgerhaemagglutination ebenso brauchbar sei wie die Röhrchenhaemagglutination und empfahl die einfachere Objektträgerhaemagglutination zur Prüfung der Seren zu verwenden. Freeman verwandte bei seinen Versuchen die O-Antigene von S. typhosa, S. schottmuelleri, Escherichia coli, Paracolobactrum, Proteus und Brucella. Sieburth machte Versuche zur Simultananlagerung verschiedener Antigene an dieselben Erythrocyten und kam zu dem Ergebnis, daß die mit polyvalenten Extrakten sensibilisierten Erythrocyten mit Seren von mit S. typhi murium infizierten Hühnern ebenso empfindlich reagierten, wie die mit monovalenten Extrakten sensibilisierten Erythrocyten. Er zeigte damit eine Möglichkeit auf, durch Verwendung polyvaltenter Antigene die verschiedensten Salmonelleninfektionen zu erfassen. Auch er verglich die Objektträgerhaemagglutination mit der Röhrchenhaemagglutination und fand, daß beide Methoden ähnliche Ergebnisse lieferten.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit besteht darin, die indirekte Objektträgerhaemagglutination zu optimalen Ergebnissen zu führen und die Anwendung dieser Methode für die Praxis zu prüfen.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. MATERIAL

a) Blut

Hammelblut, das mit Glasperlen defibriniert wurde.

b) Verdünnungsmittel

Physiologische Kochsalzlösung.

c) Antigene

Antigen aus S. poona, Antigenformel XII, XXII, z:1, 6 (Stamm 91 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Antigen aus S. typhi 6 S, Antigenformel Vi, (d) (Stamm 61 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Antigen aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII (Stamm 58 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Antigen aus S. paratyphi B 5706, Antigenformel IV, V, XII, (b):1, 2 (Stamm 6 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

d) Seren

Serum Tübingen (T 74) aus S. poona, Antigenformel XII, XXII, z:1, 6 (Stamm 91 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Serum Typhus-Vi (Robert-Koch-Institut Nr. 1282).

Serum Tübingen (T 29b) aus S. typhi O 901 W, lebend, Antigenformel IX, XII (Stamm 58 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Serum Tübingen (T 25b) aus S. paratyphi A, O-form, lebend, Antigenformel I, II, XII (Stamm 256 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Serum Tübingen (T 19a) aus S. paratyphi B, O-form, lebend, Antigenformel IV, V, XII (Stamm 248 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen).

Serum Tübingen (T 70) aus S. thompson var. Berlin 2988, Antigenformel VI, VII-1, 5 (Stamm 40 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen). Der Stamm war vor der Immunisierung 2 1/2 Stunden erhitzt worden.

Serum Tübingen (T 71) aus S. newport 563, Antigenformel VI, VIII, e, h:1, 2 (Stamm 50 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen). Der Stamm war vor der Immunisierung 2 1/2 Stunden erhitzt worden.

Serum Tübingen (T 72) aus S. london 1446, Antigenformel III, X, XXVI, 1, v: 1, 6 (Stamm 76 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen). Der Stamm war vor der Immunisierung 2 1/2 Stunden erhitzt worden.

Serum Tübingen (T 73) aus S. newington C_2, Antigenformel III, XV, e, h: 1, 6 (Stamm 84 der internationalen Salmonellenzentrale in Kopenhagen). Der Stamm war vor der Immunisierung 2 1/2 Stunden erhitzt worden.

2. VORVERSUCHE

Zunächst wurde eine Erythrocytenverdünnung gesucht, die sich für eine Haemagglutination auf dem Objektträger gut eignet. Ausgehend von normalem Blut, das mit Glasperlen defibriniert wurde, wurden Verdünnungen von 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 und 1:7 untersucht. Das Verdünnungsmittel war physiologische Kochsalzlösung. Eine Verdünnung von 1:5 erwies sich für die Ablesung als optimal.

Zur Bestimmung der Antigengebrauchsverdünnung wurden die folgenden Versuche angestellt. Es kamen das durch Phenolextraktion hergestellte Antigen aus S. poona, Antigenformel XII, XXII, z:1, 6 und das Serum XII, XXII zur Verwendung. Defibriniertes Blut wurde dreimal gewaschen und das dritte Sediment mit physiologischer Kochsalzlösung auf die ursprüngliche Blutmenge aufgefüllt. Danach erfolgte die schon erwähnte Verdünnung im Verhältnis 1:5. Diese Erythrocytensuspension wurde mit derselben Menge der verschiedenen Antigenverdünnungen (geometrische Verdünnungsreihe mit zweifachen Verdünnungsstufen, beginnend bei 1:10 und endend bei 1:1280) 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Daran anschließend wurde dieses Gemisch zweimal gewaschen, um das nicht an die Erythrocyten angelagerte Antigen zu entfernen. Dann wurde das letzte Sediment auf die ursprünglich verwendete, verdünnte Erythrocytensuspension aufgefüllt. Davon wurde ein Tropfen auf dem Glasobjektträger mit einem Tropfen verdünnten Serums vermischt. Bei der Serumverdünnung von 1:50 mit physiologischer Kochsalzlösung ergab sich eine Antigenverdünnung von 1:320. Um eine Sicherheit für die Objektträgerhaemagglutination zu haben, wurde als Antigengebrauchsverdünnung die 4fache Endverdünnung gewählt, so daß sich eine Gebrauchsverdünnung von 1:80 ergab. Zur Bestätigung der Wahl dieser Antigengebrauchsverdünnung wurde eine zweidimensionale Titration durchgeführt mit geometrischen Antigenverdünnungen von 1:20, 1:40 bis 1:320 und geometrischen Serumverdünnungen von 1:50, 1:100 bis 1:1600. Dabei ergaben sich die in Tabelle 1 aufgeführten Resultate.

Antigen	Serum 1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600
1: 20	+++	+++	++	+	+	Ø
1: 40	+++	+++	++	+	+	Ø
1: 80	+++	+++	++	+	+	Ø
1:160	++	+	+	+	Ø	Ø
1:320	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø

Tab. 1

Die Tabelle zeigt, daß mit der Antigengebrauchsverdünnung 1:80 die gleichen Ergebnisse erzielt werden wie mit höheren Antigenkonzentrationen. Dies bedeutet, daß noch eine maximale Sensibilisierung der Erythrocyten auftritt, wenn das Antigen im Verhältnis der Gebrauchsverdünnung verwendet wird. Eine höhere Antigenkonzentration ist daher nicht erforderlich.

Mit einem weiteren Versuch wurde nachgewiesen, daß den Erythrocyten mit der Antigengebrauchsverdünnung im Überschuß Antigen zur Absättigung zugeführt wird. Verwendung fand dasselbe Antigen und das homologe Serum wie im Versuch zuvor. Dabei wurde das Gemisch aus verdünnter Erythrocytensuspension und Antigenverdünnung nach der Inkubation 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Dem Überstand, in dem sich nun das überschüssige Antigen befand, wurde dann die gleiche Menge verdünnter Erythrocytensuspension zugegeben. Nach erneuter Inkubation wurde das Gemisch wieder zentrifugiert und der neue Überstand abermals mit verdünnter Erythrocytensuspension inkubiert. Auf diese Weise wurde der Versuch bis zum 5. Überstand fortgesetzt. Das beim Zentrifugieren jeweils entstandene Sediment, in dem sich die sensibilisierten Erythrocyten befanden, wurde nun mit physiologischer Kochsalzlösung so aufgefüllt, daß wieder die Erythrocytensuspension 1:5 entstand. Mit diesen so gewonnenen Erythrocytensuspensionen wurde die Objektträgerreaktion mit geometrischen Serumverdünnungen von 1:50, 1:100 bis 1:1600 ausgeführt. Es ergab sich, daß erst die Erythrocyten, die mit dem 4. Überstand sensibilisiert wurden, auf dem Objektträger keine Agglutination mehr zeigten. Dies bedeutet, daß erst im 4. Überstand kein Antigen mehr zur Sensibilisierung vorhanden war. Es besteht also eine große Sicherheit dafür, daß den Erythrocyten genügend Antigen zur maximalen Sensibilisierung zugeführt wird, wenn es im Verhältnis der Gebrauchsverdünnung zur Anwendung kommt.

Für die Bestimmung der optimalen Inkubationszeit zur Anlagerung des Antigens an die Erythrocyten im Wasserbad bei 37°C wurden als Versuchsdauer Zeiten von 1, 5, 8, 10, 20, 30, 40, 60, 90 und 120 Minuten sowie 8

Stunden gewählt. Es ergab sich eine Inkubationszeit von 10 Minuten als ausreichend, um optimale Ergebnisse zu erhalten.

Bei einer entsprechenden Versuchsreihe zur Bestimmung der optimalen Temperatur bei einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde die Mischung bei 37°C, 45°C und 52°C gehalten. Als optimal erwies sich die Temperatur von 37°C.

Nach diesen Vorversuchen wurde die folgende Methode entwickelt.

a) Waschen des mit Glasperlen defibrinierten Blutes. Blut und physiologische Kochsalzlösung werden 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Dann wird der Überstand abpipettiert und dem Sediment erneut physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Danach folgt die 2. und 3. Wäsche. Das letzte Sediment wird nun auf die ursprüngliche Blutmenge mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt.

b) Aus dieser Erythrocytensuspension wird nun eine Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 hergestellt.

c) Herstellen der Antigenverdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis der Gebrauchsverdünnung (4fache Endverdünnung).

d) Herstellen des Antigen-Erythrocyten-Gemisches. Verdünnte Erythrocytensuspension (1:5) und die gleiche Menge Antigenverdünnung (Gebrauchsverdünnung) werden vermischt.

e) Das Antigen-Erythrocyten-Gemisch wird 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

f) Nach der Inkubation wird das Antigen-Erythrocyten-Gemisch gewaschen. Antigen-Erythrocyten-Gemisch und physiologische Kochsalzlösung werden 3 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und dem Sediment erneut physiologische Kochsalzlösung zugegeben. Danach folgt die 2. Wäsche. Das letzte Sediment wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf die ursprünglich verwendete Menge der verdünnten Erythrocytensuspension aufgefüllt. Damit wird erreicht, daß die nun mit Antigen beladene Erythrocytensuspension wieder einer solchen von 1:5 entspricht.

g) Nun folgt die Haemagglutination auf dem Objektträger. Es wird ein Tropfen der mit Antigen beladenen Erythrocytensuspension und ein Tropfen Serumverdünnung (geometrische Verdünnungsreihe mit 2fachen Titerstufen) mit Hilfe einer Kapillare auf den Glasobjektträger gebracht. Diese beiden Tropfen werden vermischt. Dann wird der Objektträger leicht hin und her geschwenkt und nach 2 - 3 Minuten die Agglutination abgelesen.

3. VERSUCHE ZUR VERBESSERUNG DER ERGEBNISSE DER INDIREKTEN OBJEKTTRÄGERHAEMAGGLUTINATION

Die beschriebene Methode bildet die Grundlage aller nun folgenden Versuche.

a) Verwendung verschieden hergestellter Antigene

Es handelt sich um zwei verschieden hergestellte Antigene aus S. typhi 6 S, Antigenformel Vi,(d). Das eine Antigen war durch Autoclavieren (1 Stunde bei 120°C) hergestellt worden, das andere durch Phenolextraktion, wie sie von WESTPHAL und Mitarbeitern (1952) durchgeführt wurde. Beide Antigene wurden mit dem Serum Typhus-Vi und zur Kontrolle mit dem Serum IX, XII untersucht. Mit dem Typhus-Vi-Serum ergab sich bei dem autoclavierten Antigen ein Titer, der um eine Verdünnung höher war als der beim phenolextrahierten Antigen. Bei der Kontrolle mit dem Typhus-O-Serum war die Reaktion wie zu erwarten mit beiden Antigenen negativ, weil für die Antikörper des Serums keine homologen Antigene zur Reaktion vorhanden waren.

Da das autoclavierte Antigen leichter und rascher herzustellen ist und wie der Versuch zeigte, bessere Ergebnisse liefert, wurde bei den folgenden Versuchen nur Antigen verwendet, das durch Autoclavieren hergestellt worden war.

b) Prüfung des autoclavierten Antigens auf seine spezifische Reaktionsfähigkeit

Das aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII hergestellte Antigen wurde mit den folgenden Seren geprüft.

1. Serum I, II, XII.
2. Serum IV, V, XII.
3. Serum VI VII.
4. Serum VI, VIII.
5. Serum IX, XII.
6. Serum III, X, XXVI.
7. Serum III, XV.

Bei allen Seren, bei denen auf Grund der Antigenformel eine Agglutination zu erwarten war, wurden positive Reaktionen festgestellt. Dies war der Fall bei den Versuchen mit den Seren 1., 2. und 5. Bei den übrigen Versuchen waren die Ergebnisse negativ, wodurch die spezifische Reaktion des autoclavierten Antigens erwiesen war.

c) Behandlung der Erythrocyten mit Trypsin

Diese Trypsinbehandlung wurde von NETER und Mitarbeitern (1959) beschrieben. Sie wurde durchgeführt, um die Aufnahmebereitschaft der Erythrocyten gegenüber dem Antigen zu steigern. Dabei fanden folgende Materialien Verwendung.

1. Antigen aus S. paratyphi B 5706, Antigenformel IV, V, XII, (b):1,2.
   Serum IV, V, XII.
2. Antigen aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII.
   Serum IX, XII.
3. Antigen aus S. typhi 6 S, Antigenformel Vi, (d).
   Serum Typhus-Vi.

Die Trypsinlösung wurde aus Trypsinpulver (Merck) und physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die verwendeten Trypsinlösungen waren geometrische Verdünnungen mit 2fachen Verdünnungsstufen beginnend bei 1 %, 1/2 % und endend bei 1/128 %.

Verdünnte Erythrocytensuspension wurde mit der gleichen Menge Trypsinverdünnung gemischt. Dieses Gemisch wurde inkubiert

1. 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C,
2. 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C,
3. 30 Minuten bei Zimmertemperatur,
4. 30 Minuten im Kühlschrank bei 6-8°C.

Anschließend wurde das Gemisch zweimal gewaschen und das letzte Sediment auf die ursprüngliche Menge der verdünnten Erythrocytensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Diese Erythrocytensuspension wurde mit der gleichen Menge Antigenverdünnung versetzt und die Objektträgerhaemagglutination durchgeführt. Das Ergebnis war dasselbe wie das des Kontrollversuchs, bei dem die verdünnte Erythrocytensuspension nicht mit Trypsin behandelt worden war.

Die Versuche wurden nun so abgewandelt, daß zur verdünnten Erythrocytensuspension die gleiche Menge eines Gemisches gegeben wurde, das zur einen Hälfte aus Trypsinverdünnung und zur andern Hälfte aus Antigenverdünnung (doppelte Gebrauchsverdünnung) bestand. Das Gemisch wurde nun 10 bzw. 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert und die Objektträgerhaemagglutination durchgeführt. Auch dieses Ergebnis entsprach dem des Kontrollversuchs, der ohne Trypsin durchgeführt worden war.

d) Verwendung eines Phosphatpuffers

Verwendung fand der Phosphatpuffer nach Sörensen mit einem pH-Wert von 7,2. Der Phosphatpuffer wurde hergestellt aus 7 cm^3 Na_2HPO_4 und 3 cm^3 KH_2PO_4. Die osmotische Einstellung des Phosphatpuffers erfolgte durch mikroskopische Betrachtung eines Gemisches, bestehend aus Pufferlösung und destilliertem Wasser, zu dem Blut gegeben wurde. Nun wurde die Verdünnung des Phosphatpuffers gesucht, bei der die Erythrocyten ihre normale Form behielten, d.h. weder gebläht wurden noch in Stechapfelform übergingen. Als brauchbare osmotische Einstellung des Phosphatpuffers erwies sich die Verdünnung 1:5, 6.

Dieser Phosphatpuffer wurde in den folgenden Versuchen an Stelle der physiologischen Kochsalzlösung verwendet.

Mit diesem Phosphatpuffer wurde die Gebrauchsverdünnung des Antigens aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII mit dem Serum IX, XII bestimmt. Die Gebrauchsverdünnung unterschied sich nicht von der des Kontrollversuchs, der mit physiologischer Kochsalzlösung ausgeführt worden war.

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Trypsinversuche wurden nun noch so abgewandelt, daß an die Stelle der physiologischen Kochsalzlösung der Phosphatpuffer trat. Die damals erzielten Ergebnisse erfuhren dadurch keine Änderung.

e) Verwendung von Oxalat-Blut

An die Stelle des mit Glasperlen defibrinierten Blutes trat in den folgenden Versuchen Blut, das mit 1,3 %igem Natriumoxalat ungerinnbar gemacht worden war. Zu diesem Zweck wurde das Natriumoxalat dem Blut im Verhältnis 1:4 zugegeben. Mit dem so behandelten Blut wurde unter Verwendung des Phosphatpuffers die Gebrauchsverdünnung des Antigens aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII mit dem Serum IX, XII bestimmt. Es ergab sich kein Unterschied zwischen dieser Gebrauchsverdünnung und der, die im Kontrollversuch mit physiologischer Kochsalzlösung und mit Glasperlen defibriniertem Blut erzielt worden war.

Mit Oxalat-Blut und Phosphatpuffer wurden schließlich noch Trypsinversuche wie im Abschnitt c) ausgeführt. Die Versuchsergebnisse erfuhren dadurch keine Veränderung.

f) Behandlung des Antigens mit Natronlauge

Die NaOH-Behandlung, die von STAUB (1954), sowie von LANDY und Mitarbeitern (1961) beschrieben worden war, wurde durchgeführt, um eine bessere Anlagerung des Antigens an die Erythrocyten herbeizuführen. Verwendet wurde das Antigen aus S. paratyphi B 5706, Antigenformel IV, V, XII, (b):1,2 und das Serum IV, V, XII. NaOH wurde in den Stärken 0,05n, 0,025n, 0,0125n und 0,00625n verwendet.

Zu der NaOH-Verdünnung wurde die gleiche Menge Antigen (doppelte Gebrauchsverdünnung) gegeben. Die Inkubation erfolgte

1. 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C,
2. 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C,
3. 30 Minuten bei Zimmertemperatur,
4. 30 Minuten im Kühlschrank bei 6-8°C.

Daran anschließend wurde zu diesem Gemisch die gleich große Menge verdünnter Erythrocytensuspension gegeben und die indirekte Objektträgerhaemaggluti-

nation ausgeführt. Die Ergebnisse entsprachen denen des Kontrollversuchs, bei dem das Antigen nicht mit NaOH behandelt worden war.

Diese Versuche wurden nun so abgewandelt, daß mengenmäßig unverändert verdünnte Erythrocytensuspension, verdünnte NaOH und die Antigenverdünnung gleichzeitig zusammengebracht wurden. Nach einer Inkubation von 10 bzw. 30 Minuten im Wasserbad bei 37°C erfolgte dann die Objektträgerhaemagglutination. Die Ergebnisse zeigten auch bei dieser Versuchsabwandlung keine Änderung.

g) Verwendung von zentrifugiertem Antigen

Vor dem Gebrauch wurde das Antigen 10 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert. Verwendung fand dann der Überstand in dem sich das gelöste Antigen befand. Die Versuche wurden ausgeführt mit denselben Antigenen und homologen Seren wie sie im Abschnitt c) aufgeführt sind. Die drei Versuche erbrachten dieselben Ergebnisse wie die Kontrollversuche mit nicht zentrifugiertem Antigen.

h) Verwendung einer feuchten Kammer

Verwendet wurden wieder die Antigene und homologen Seren wie im Abschnitt c). Nachdem die beiden Tropfen (Antigen-Erythrocyten-Gemisch und Serumverdünnung) auf dem Objektträger vermischt waren, wurde der Objektträger in eine feuchte Kammer gebracht, die 10 bzw. 30 Minuten in den Brutschrank bei 37°C gestellt wurde. Die nach 10 Minuten abgelesenen Reaktionen wiesen gegenüber den Kontrollversuchen ohne feuchte Kammer keine Unterschiede auf. Beim Ablesen nach 30 Minuten waren dagegen geringfügige Titersteigerungen zu verzeichnen, die aber eine derartige Verlängerung der Versuchsdauer kaum rechtfertigen.

i) Verwendung von Plastikobjektträgern

Hierbei fanden wieder die Antigene und homologen Seren wie im Abschnitt c) Verwendung. Die Objektträger aus Plastik brachten im Vergleich mit denen aus Glas keine anderen Ergebnisse.

k) Verwendung eines frisch gezüchteten Typhus-O-Stammes

Da es sich bei den bisher verwendeten Stämmen um Sammlungsstämme handelte, wurde abschließend noch geprüft, ob ein frisch gezüchteter Typhus-O-Stamm eine Titersteigerung bringt. Verwendet wurde das Antigen eines aus Patientenstuhl gezüchteten Typhus-O-Stammes, der durch Phagentypisierung als Vi-negativ gekennzeichnet worden war und das Serum IX, XII. Eine Titersteigerung konnte dadurch nicht erzielt werden.

1) Ergebnis

Insgesamt zeigen die durchgeführten Versuche, daß optimale Versuchsbedingungen gegeben sind, wenn bei der indirekten Objektträgerhaemagglutination autoclaviertes Antigen, mit Glasperlen defibriniertes Blut und physiologische Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel verwendet werden. Alle nun folgenden Versuche werden daher unter diesen optimalen Bedingungen durchgeführt.

4. VERSUCHE ZUR ANLAGERUNG VERSCHIEDENER ANTIGENE AN DIE GLEICHEN ERYTHROCYTEN

Wie NETER und Mitarbeiter (1952), LANDY und Mitarbeiter (1954) und SIEBURTH (1958) beschrieben haben, besteht die Möglichkeit verschiedene Antigene an die gleichen Erythrocyten anzulagern. Solche Anlagerungsversuche wurden nun auf zweierlei Arten durchgeführt. Einmal erfolgte eine Successivadsorption der Antigene an die Erythrocyten, zum andern eine Simultanadsorption.

a) Successivadsorption

Hierbei fanden die folgenden Antigene und Seren Verwendung.

Antigen (1): Antigen aus S. paratyphi B 5706, Antigenformel IV, V, XII, (b):1, 2.
Serum (1): Serum IV, V, XII.
Antigen (2): Antigen aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII.
Serum (2): Serum IX, XII.
Antigen (3): Antigen aus S. typhi 6 S, Antigenformel Vi, (d).
Serum (3): Serum Typhus-Vi.

Zu verdünnter Erythrocytensuspension wurde die gleiche Menge Antigen (1) im Verhältnis der Gebrauchsverdünnung gegeben. Es folgte die Inkubation von 10 Minuten im Wasserbad bei 37°C. Danach wurde das Gemisch zweimal gewaschen und das letzte Sediment auf die ursprünglich verwendete Menge der verdünnten Erythrocytensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Dazu wurde die gleiche Menge Antigen (2) im Verhältnis der Gebrauchsverdünnung gegeben und wie oben verfahren. Schließlich wurde auf dieselbe Weise das Antigen (3) zugegeben. Mit dieser Suspension dreifach sensibilisierter Erythrocyten wurde nun die Objektträgerhaemagglutination durchgeführt, wobei die aufgeführten Seren in geometrischer Verdünnungsreihe mit zweifachen Titerstufen jeweils Verwendung fanden. Der Versuch wurde nun so abgewandelt, daß die drei Antigene den Erythrocyten in allen möglichen Reihenfolgen zugegeben wurden.

1. Erythrocytensuspension + Antigen (1) + Antigen (2) + Antigen (3),
2. Erythrocytensuspension + Antigen (1) + Antigen (3) + Antigen (2),
3. Erythrocytensuspension + Antigen (2) + Antigen (1) + Antigen (3),
4. Erythrocytensuspension + Antigen (2) + Antigen (3) + Antigen (1),
5. Erythrocytensuspension + Antigen (3) + Antigen (1) + Antigen (2),
6. Erythrocytensuspension + Antigen (3) + Antigen (2) + Antigen (1).

Bei der Auswertung der Haemagglutinationsergebnisse wurde so verfahren, daß die Titer der sechs Versuchsabwandlungen, die sich mit der Verdünnungsreihe ein und desselben Serums ergaben, miteinander verglichen wurden. Dabei stellte sich heraus, daß jedes Serum mit den angeführten Versuchsabwandlungen einen konstanten Titer lieferte. Es war somit erwiesen, daß es gleichgültig ist, in welcher Reihenfolge die Antigene an die Erythrocyten angelagert wurden. Diese konstanten, unter sich aber verschiedenen Titer, die mit den drei Seren erzielt wurden, waren jeweils um eine Verdünnung niedriger als die, die sich bei der Anlagerung nur eines Antigens an die Erythrocyten mit dem homologen Serum ergaben. Im Vergleich zur Anlagerung nur eines Antigens an die Erythrocyten hatte damit die nacheinander durchgeführte Anlagerung verschiedener Antigene zur Folge, daß das Erythrocyten-Antigen-Gemisch an Empfindlichkeit gegenüber den entsprechenden Seren abnahm. Diese Beobachtung wurde bei 5 Kontrollversuchen regelmäßig bestätigt.

b) Simultanadsorption

Die verwendeten Materialien waren dieselben wie in den vorangegangenen Versuchen.

Zu verdünnter Erythrocytensuspension wurde die dreifache Menge eines Gemisches gegeben, das zu gleichen Teilen aus Antigen (1), Antigen (2) und Antigen (3), jeweils im Verhältnis der Gebrauchsverdünnung bestand. Nun folgte der normale Arbeitsgang bis zur Agglutination auf dem Objektträger. Mit Serum (1) stellte sich dabei derselbe Titer ein wie in dem Versuch mit diesem Serum im vorangegangenen Abschnitt, wo die Antigene nacheinander an die Erythrocyten angelagert worden waren. Entsprechende Ergebnisse traten auch bei den Seren (2) und (3) auf. Auch diese Beobachtungen wurden jeweils durch 5 Kontrollversuche erhärtet.

c) Zusammenstellung der Versuchsergebnisse

	Adsorption eines einzigen Antigens	Successivadsorption von 3 Antigenen	Simultanadsorption von 3 Antigenen
Titer mit Serum S. paratyphi BO	1: 800	1:400	1:400
Titer mit Serum S. typhi O	1: 800	1:400	1:400
Titer mit Serum S. typhi Vi	1:1600	1:800	1:800

Tab. 2

Es ergab sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LANDY (1954), daß bei der Anlagerung verschiedener Antigene an dieselben Erythrocyten die Art und Weise der Anlagerung keinen Einfluß auf die erzielten Titer hat. Im Gegensatz zu SIEBURTH (1958) stellte sich jedoch heraus, daß diese Titer nicht mit denen bei der Anlagerung nur eines einzigen Antigens übereinstimmen, sondern jeweils um eine Verdünnung niedriger sind.

5. HALTBARKEITSPRÜFUNG DER SENSIBILISIERTEN ERYTHROCYTEN-SUSPENSION

Zur Prüfung der Haltbarkeit der mit einem einzigen Antigen sensibilisierten und gewaschenen Erythrocytensuspension wurden Versuche angestellt, bei denen das Gemisch im Kühlschrank bei 6 - 8°C aufbewahrt wurde. Verwendung fand dabei das Antigen aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII und das Serum IX, XII. Bei den im Abstand von 24 Stunden ausgeführten Objektträgerhaemagglutinationen ergab sich, daß nach 24 Stunden noch das gleiche Ergebnis auftrat wie am Anfang, jedoch nach 48 Stunden eine Verschlechterung des Versuchsergebnisses zu verzeichnen war.

6. VERGLEICH DER INDIREKTEN OBJEKTTRÄGERHAEMAGGLUTINATION MIT DER WIDAL-REAKTION

Die Widal-Reaktion, die bei der Typhus- und Paratyphusdiagnose zur Anwendung kommt, erfolgte in der Weise, daß geometrische Verdünnungsreihen von Patientenseren mit zweifachen Titerstufen hergestellt wurden. Als Verdünnungsmittel diente physiologische Kochsalzlösung. Zu diesen Verdünnungen wurde dann jeweils die gleiche Menge Antigenverdünnung gegeben und das Gemisch 10 - 12 Stunden im Wasserbad bei 52°C inkubiert. Danach erfolgte die Ablesung der Agglutination. Das verwendete Alkoholantigen war mit physiologischer Kochsalzlösung so verdünnt worden, daß eine leicht opaleszente Lösung entstand.

Die indirekte Objektträgerhaemagglutination wurde mit der anfangs entwikkelten Methode ausgeführt.

a) Untersuchung der Patientenseren mit dem Antigen aus S. typhi O 901 W, Antigenformel IX, XII.

Untersucht wurden 567 Seren. Dabei ergaben sich die in Tabelle 3 aufgeführten Resultate.

Anzahl der Seren	Widal-reaktion	Indirekte Objektträger-haemagglutination
336	Ø	Ø
0	+	Ø
112	+	+
119	Ø	+

Tab. 3

Daraus war ersichtlich, daß die Objektträgerhaemagglutination bei 21 % aller untersuchten Seren noch ein positives Ergebnis lieferte, während diese bei der Widal-Reaktion nicht mehr erfaßt werden. Die indirekte Objektträgerhaemagglutination war demnach empfindlicher als die Widal-Reaktion.

Bei einem Titervergleich der 112 Seren, die bei beiden Reaktionen positiv waren, ergaben sich die in Tabelle 4 zusammengestellten Resultate. Aus ihr sind die sich entsprechenden Titer beider Reaktionen ersichtlich.

		Indirekte Objektträgerhaemagglutination							
		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560
	1: 50	8	9	3	-	-	-	-	-
W	1: 100	-	-	19	15	-	-	-	-
i	1: 200	-	-	-	10	13	1	-	-
d	1: 400	-	-	-	-	6	14	-	-
a	1: 800	-	-	-	-	-	2	9	-
l	1:1600	-	-	-	-	-	-	2	-
	1:3200	-	-	-	-	-	-	-	1

Tab. 4

b) Untersuchung der Patientenseren mit dem Antigen aus S. paratyphi B 5706, Antigenformel IV, V, XII, (b):1, 2.

Es wurden dieselben 567 Seren wie in der vorhergehenden Versuchsreihe untersucht. Dabei ergaben sich die in Tabelle 5 aufgeführten Resultate.

Anzahl der Seren	Widal-reaktion	Indirekte Objektträger-haemagglutination
378	Ø	Ø
0	+	Ø
28	+	+
161	Ø	+

Tab. 5

Daraus war ersichtlich, daß mit der Objektträgerhaemagglutination bei 28 % aller untersuchten Seren noch ein positives Ergebnis erzielt wurde, während die Widal-Reaktion negativ war. Die indirekte Objektträgerhaemagglutination war in dieser Versuchsreihe also ebenfalls empfindlicher als die Widal-Reaktion.

Wegen der geringen Zahl von Seren, die bei beiden Reaktionen positiv waren, ergab ein Titervergleich keine schlüssigen Resultate.

c) Um eine Verfälschung der Haemagglutinationsergebnisse durch eventuell vorhandene Heteroagglutinine auszuschließen, wurden folgende Versuche angestellt. Bei den Seren, die sowohl bei der Untersuchung auf Typhus-O als

auch bei der auf Paratyphus-BO in der indirekten Objektträgerhaemagglutination ein positives Ergebnis lieferten, wurde als Kontrolle die Reaktion auch mit nicht sensibilisierter Erythrocytensuspension geprüft. Dabei ergab sich, daß die Resultate der indirekten Objektträgerhaemagglutination durch Heteroagglutinine nicht beeinflußt worden waren.

III. DISKUSSION

Die bei der indirekten Objektträgerhaemagglutination angewendeten Methoden unterscheiden sich voneinander im wesentlichen in zwei Punkten. Einmal in der Zeit, während der die Erythrocytensuspension und die Antigenverdünnung im Wasserbad inkubiert werden und zum andern, in der Zeit, in der die beiden Tropfen (Antigen-Erythrocyten-Gemisch und Serumverdünnung) auf dem Objektträger bis zur Ablesung des Ergebnisses aufeinander einwirken. Bei FELSENFELD und Mitarbeitern (1955) sowie bei FREEMAN und Mitarbeiter (1955) beträgt die Inkubationszeit im Wasserbad bei 37°C 2 Stunden, bei SIEBURTH (1958) nur 45 Minuten. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Inkubationszeit auf 10 Minuten herabgesetzt, ohne daß dadurch das Ergebnis eine Beeinträchtigung erfuhr. Auf dem Objektträger erfolgt die Ablesung bei Felsenfeld und Freeman nach 15 bzw. 30 Minuten, bei Sieburth bereits nach einer Minute. Diese Zeit beträgt in der vorliegenden Arbeit 2 - 3 Minuten.

Die entwickelte Objektträgermethode für die indirekte Haemagglutination hat nicht nur Ergebnisse erbracht, die mit der Widal-Reaktion übereinstimmen, sondern sie liefert diese Ergebnisse auch in wesentlich kürzerer Zeit. Während bei der Widal-Reaktion das Ergebnis erst am darauf folgenden Tag vorliegt, kann bei der indirekten Objektträgerhaemagglutination, vorausgesetzt, daß gewaschenes Blut und Antigen vorhanden sind, das Ergebnis für das erste Patientenserum bereits nach 40 - 50 Minuten erhalten werden. Jedes weitere Patientenserum beansprucht dann nur noch knapp 15 Minuten. In dieser Tatsache liegt eine wesentliche Bedeutung der indirekten Objektträgerhaemagglutination für die Praxis. Denn es besteht die Möglichkeit, die Widal-Reaktion insoweit zu ersetzen, daß sie nur noch in den Fällen zur Kontrolle herangezogen wird, in denen die Objektträgerhaemagglutination einen Titer erbracht hat.

Die indirekte Haemagglutination ist auf den Nachweis der O-Agglutinine beschränkt und schließt die H-Agglutinine aus. Diese Tatsache jedoch kommt ihrer diagnostischen Bedeutung zugute. Denn liegt eine TAB-Schutzimpfung vor, dann ist die H-Agglutination weder qualitativ noch quantitativ verwertbar, wie dies von BADER (1940) nachgewiesen wurde. Einer positiven O-Agglutination kommt dagegen große diagnostische Bedeutung zu: Sie ist ein Hinweis auf das Vorliegen einer Erkrankung. Da in der Praxis aber nur selten bekannt ist, ob eine Schutzimpfung durchgeführt worden ist oder nicht, muß dem Ergebnis der O-Agglutination größere Bedeutung zugemessen werden als dem der H-Agglutination. Mit der indirekten Haemagglutination werden also im Rahmen der qualitativen Rezeptorenanalyse die wichtigeren O-Agglutinine erfaßt.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Für die indirekte Haemagglutination wurde eine Objektträgermethode entwickelt. Sie wurde in allen Reaktionsphasen optimal gestaltet. Die indirekte Objektträgerhaemagglutination ist ein Verfahren, das gegenüber der Widal-Reaktion die Vorteile der Einfachheit und Schnelligkeit auf sich vereinigt. Die Höhe der Agglutinationstiter ist mit denen der Widal-Reaktion vergleichbar, sie liegen durchweg etwas höher.

V. LITERATUR

BADER, R. E.: Gruber-Widalsche Reaktion und Typhusschutzimpfung.
Münch. med. Wschr., 87, 1257, 1940.

FELSENFELD, O., FREEMAN, N. L. and MOORING, V. L.: Tube and slide technic in the hemagglutination of Vibrio comma.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 4, 318, 1955.

FREEMAN, N L., FELSENFELD, O.: Slide hemagglutination test with O antigens of enteric organisms and brucella.
Am. J. Clin. Pathol., 25, 332, 1955.

KEOGH, E. V., NORTH, E. A. and WARBURTON, M. F.: Haemagglutinins of the Haemophilus group.
Nature, 160, 63, 1947.

KEOGH, E. V., NORTH, E. A. and WARBURTON, M. F.: Adsorption of bacterial polysaccharides to erythrocytes.
Nature, 161, 687, 1948.

LANDY, M.: On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharide and protein antigens.
Am. J. Public Health, 44, 1059, 1954.

LANDY, M., JOHNSON, A. G. and WEBSTER, M. E.: Studies on Vi-Antigen
Am. J. of Hyg., 73, 55, 1961.

MIDDLEBROOK, G., DUBOS, R. J: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli.
J. Exp. Med., 88, 521, 1948.

NETER, E., BERTRAM, L. F., ZAK, D. A., MURDOCK, M. R. and ARBESMAN, C. E.: Studies on hemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera.
J. Exp. Med., 96, 1, 1952.

NETER, E. and GORZYNSKI, E. A.: Studies on indirect Staphylococcal Hemagglutination.
Z. Immunforschg und exp. Therap., 118, 269, 1959.

SIEBURTH, J. Mc. N.: The indirect hemagglutination test in the avian Salmonella problem.
Am. J. Vet. Res., 19, 729, 1958.

STAUB, A. M.: Role des anticorps antipolyosidiques dans l'agglutination des Bacilles typhiques.
Ann. inst. Pasteur, 86, 618, 1954.

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., BIESTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser.
Z. Naturforschg, 7 b, 148, 1952.

An dieser Stelle möchte ich meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. med. R. E. Bader für die freundliche Überlassung des Themas und für die Unterstützung meiner Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Am 4. Juni 1939 wurde ich als Tochter des Studienassessors Oskar Bleyh und dessen Ehefrau Elisabeth-Charlotte geb. Renz in München geboren. Meine Schulzeit schloß ich mit der Reifeprüfung am 7. März 1958 am Progymnasium in Neckarsulm ab. Das Studium der Medizin begann ich im Sommer-Semester 1958 an der Universität Tübingen. Hier legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung am 30. Oktober 1959 und die ärztliche Vorprüfung am 22. April 1961 ab. Auch die klinischen Semester absolvierte ich in Tübingen und arbeitete am dortigen Hygiene-Institut von März 1962 bis Juli 1963 an der vorliegenden Dissertation. Am 29. Juni 1964 schloß ich mit dem medizinischen Staatsexamen mein Studium an der Universität Tübingen ab.